

Title	Uptake and metabolism of radiolabeled GM1, ganglioside in skin fibroblasts from controls and patients with GM1 gan-gliosidosis
Author(s)	緑川, 光雄
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37742">https://hdl.handle.net/11094/37742</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	みどり かわ みつ お 雄
博士の専攻分野の名称	博 士 ( 医 学 )
学位記番号	第 1 0 0 9 0 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 16 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	<b>Uptake and metabolism of radiolabeled GM<sub>1</sub> ganglioside in skin fibroblasts from controls and patients with GM<sub>1</sub> gangliosidosis</b> (GM <sub>1</sub> gangliosidosis 患者及び正常の皮膚線維芽細胞における放射性 GM <sub>1</sub> ganglioside の取り込みと代謝)
論文審査委員	(主査) 教 授 岡田伸太郎 (副査) 教 授 柳原 武彦 教 授 谷口 直之

## 論 文 内 容 の 要 旨

### (目 的)

GM<sub>1</sub> ガングリオシドシースは、 $\beta$ -ガラクトシターゼの欠損により生じる、常染色体劣性遺伝の進行性中枢変性疾患である。その病型は、発症時期により、乳児型、若年型、成人型の 3 型に分類され、臨床症状は様々な様相を示すが、その臨床的異質性の病態発現機構は明らかではない。我々は、血清を含んだ培地においてもホスファチジルセリン (PS) が、ガングリオシドの摂取率を高めることを見だし、この条件下で、代謝産物が容易に追跡できるスフィンゴシン-3-<sup>3</sup>H ガングリオシドを合成し、細胞に添加し、正常細胞および GM<sub>1</sub> ガングリオシドシース各病型での代謝を検討した。

### (方法ならびに成績)

GM<sub>1</sub> ガングリオシドシース由来培養皮膚線維芽細胞は、我々の研究室で確立したものを用いた。GM<sub>1</sub> ガングリオシドは、18の炭素鎖のみを持つスフィンゴシンの 3 の位置に、<sup>3</sup>H ラベル、精製し、薄層クロマトグラフィー (HPTLC) 上 98.5% の純度のものを調製した。<sup>3</sup>H-GM<sub>1</sub> (比活性 55 mCi / nmol) 2 nmol と 0-80  $\mu$ g の PS を、2 ml の 10% 牛胎児血清 (FCS) を含む Eagle's MEM 培地に加え、5 分間超音波浴で溶かし、6 cm のデッシュの細胞に加え、1, 2, 3 日間インキュベートした。パルススチーイス実験では、2 nmol の <sup>3</sup>H-GM<sub>1</sub> (比活性 150 mCi / nmol) で 2 時間パルスし、GM<sub>1</sub> を含まない培地に交換して 0, 3, 6, 9, 12, 24 時間後インキュベーションした。細胞は 0.25% トリプシンではがし、1% BSA を含む PBS で中和洗浄し更に 2 度 PBS のみで洗浄後、200  $\mu$ l の水を加えホモゲナイズし、10  $\mu$ l をシンチレーター (ACS II) に溶かし、シンチレーションカウンター (Mark III) でカウントし、10  $\mu$ l を蛋白測定に用いた。残りから脂質を 20 倍量の C/M (2/1) で抽出し、HPTLC にて C/M/

W (70/30/4.5) で展開し、フルオログラフィーにて検出した。代謝産物は、酵素分解と2次元クロマトグラフィーで同定し、また各々のスポットをかき取りシンチレーターでカウントし、合計のカウントからの比率で分解率を測定した。酵素活性は、4-MU- $\beta$ -galactopyranoside およびガラクトースに $^3\text{H}$ をラベルした  $\text{GM}_1$  ガングリオシドを用いて測定した。蛋白はLowry法で測定した。

培養皮膚線維芽細胞での20時間摂取量を、PSを0から40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで変え、FCSを加えない条件では、0.8nmol/mg prot.の取り込みから1.6nmol/mg prot.の取り込みまで、比較的一定でよく取り込まれていたが、細胞が障害されていた。FCSを加えた条件ではPSが無いとき0.2nmol/mgでほとんど取り込まれなかったが40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の時1.6nmol/mgまで取り込みはPSの量に比例して増加していた。正常細胞のパルスチェイス実験では、 $\text{GM}_1$ は最初の3時間0.05nmol/mg prot.で分解され、順次  $\text{GM}_2$ ,  $\text{GM}_3$ , ラクトシルセラミド, セラミドモノヘキソシド, セラミドへと分解され、遊離したスフィンゴシンはスフィンゴミエリン合成に利用された。1日目のパルス実験で  $\text{GM}_1$  ガングリオシドーシスでは成人型>若年型>幼児型の順に、54-57.5%>20.4-43.9%>2.7-5.4%と  $\text{GM}_1$  が分解され(正常では64 $\pm$ 5.7%)、成人型と正常例では近い値であったが  $\text{GM}_1$  ガングリオシドーシスの各型で、細胞内での分解率に差が明らかに認められた。

#### (総括)

ホスファチジルセリンを培地に加えるとその量に比例して血清の取り込み阻害効果を抑制することがわかり、これを利用して培地に血清を加えたままで  $\text{GM}_1$  の負荷をおこなうことが可能となった。 $\text{GM}_1$  は分解されて  $\text{GM}_2$ ,  $\text{GM}_3$ , ラクトシルセラミド, セラミドモノヘキソシド, セラミドとなりこの後遊離したスフィンゴシンが合成系に入りスフィンゴミエリンができることがたしかめられた。酵素活性では、4-MU-galacto-pyranosideを基質としたとき乳児型, 若年型, 成人型ではそれぞれ正常の1-3%, 1-10%, 6-20%で、天然基質ではそれぞれ0-5%, 10-20%, 30%であった。これらの酵素活性からは、オーバーラップしており各型の鑑別はむずかしいが、in vivoでの分解を合わせ検討すると、鑑別が可能になった。我々の方法は  $\text{GM}_1$  から始まるガングリオシドの分解系の流れを包括的に把握し、これに酵素活性を合わせることで  $\text{GM}_1$  ガングリオシドーシスをはじめとするガングリオシド分解異常症の病態を追求するのに適当と思われる。

### 論文審査の結果の要旨

胎児牛血清は  $\text{GM}_1$  の細胞への取り込みを阻害するが、ホスファチジルセリンを培地に加えると、その量に比例して阻害効果を抑制することがわかった。これを利用して培地に血清を加えたままで  $\text{GM}_1$  の負荷をおこなうことが可能となったので、 $\text{GM}_1$  gangliosidase 酵素活性によっては、従来難しかった、 $\text{GM}_1$  gangliosidosis の乳児型, 若年型, 成人型の各型の鑑別が、in vivoでの sphingosine  $^3\text{H}$ - $\text{GM}_1$ -ganglioside の分解を合わせ検討する事により可能になった。この論文は、更に  $\text{GM}_1$  を始めとする ganglioside 代謝異常症の診断にも有用と考えられる方法であり学位に値するものである。